FACULTÉ DE PHARMACIE UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ANNÉE SCOLAIRE 1940-1941 N° 285

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE D'UNE MÉTHODE COLORIMÉTRIQUE NOUVELLE DE DOSAGE DES SUCRES

THÈSE

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT

le 1er Juillet 1941

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE STRASBOURG

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

(MENTION PHARMACIE)

PAR

MONIA BELLA

Pharmacien

Examinateurs de la thèse { M. CH. LAPP, Professeur, *Président*
Mme S. LALLEMAND, Agrégée
M. P. CORDIER, Professeur } *Juges.*

CLERMONT-FERRAND-PARIS
IMPRIMERIES PAUL VALLIER

1941

FACULTÉ DE PHARMACIE UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ANNÉE SCOLAIRE 1940-1941 N° 285

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE D'UNE MÉTHODE COLORIMÉTRIQUE NOUVELLE DE DOSAGE DES SUCRES

THÈSE

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT

le 1er Juillet 1941

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE STRASBOURG

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

(MENTION PHARMACIE)

PAR

MONIA BELLA

Pharmacien

Examinateurs de la thèse { M. CH. LAPP, Professeur, *Président*
Mme S. LALLEMAND, Agrégée
M. P. CORDIER, Professeur } *Juges.*

CLERMONT-FERRAND-PARIS
IMPRIMERIES PAUL VALLIER

1941

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. A. SARTORY, *Doyen*, C. ✻, I. ✿, C. ✺
VOLMAR, *Assesseur*, ✻, I. ✿
MARANDON, *Secrétaire*, ✻, ⚜, ⚚, ✿.

DOYEN HONORAIRE

M. JADIN, O. ✻, I. ✿, ✺

PROFESSEURS

MM. A. SARTORY, C. ✻, I. ✿, C. ✺	Bactériologie.
LAVIALLE, ✻, I. ✿, ✺	Botanique.
VOLMAR, ✻, I. ✿	Chimie organique.
GUILLAUME, ✻, ⚚, I. ✿, ✺	Pharmacie galénique.
LAPP, I. ✿	Chimie analytique.
CORDIER, ✿	Pharmacie chimique.
R. SARTORY, ✺, ✿	Matière médicale.

MAITRE DE CONFÉRENCE

M. DUQUENOIS	Toxicologie.

PROFESSEUR HONORAIRE

M. JADIN, O. ✻, I. ✿, ✺

COURS COMPLÉMENTAIRES

MM. A. SARTORY	Hygiène.
LAVIALLE	Hydrologie.
VOLMAR	Chimie minérale.
GUILLAUME	Zoologie.
LAPP	Physique.
PRÉLOT	Législation et Déontologie.
CORDIER	Chimie biologique.
R. SARTORY	Cryptogamie.

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM. COLLARD, ✻, ⚚, I✿	Chimie pharmaceutique.
Mme LALLEMAND, ✿	Chimie et Physique.
LEDOUX	Bactériologie et Parasitologie.
JÆGER	Histoire Naturelle.

UNIVERSITÉ DE CLERMONT

ECOLE DE PLEIN EXERCICE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

PROFESSEURS DE PHARMACIE

DIRECTEUR :

M. J. CASTAIGNE, C. ✻, I. ✿ ..... Membre associé national de l'Académie de Médecine.

PROFESSEURS :

MM. L. BERT, I. ✿ ..... Chimie biologique.
Mme L. BLANQUET, ✻, I. ✿ ..... Physique.
MM. P. FEBVRE, ✿ ..... Pharmacie galénique.
J.-B. FOURNIER, I. ✿ ..... Matière médicale.
M. D. GAUTHIER, I. ✿ ..... Chimie.
M. LEVADOUX, O. ✻, I. ✿ .... Hydrologie.
P. MORNAC, I. ✿ ..... Bactériologie et hygiène.
R. VAURS, ✿ ..... Histoire naturelle. Parasitologie.

PROFESSEUR SUPPLÉANT

M. G. DASTUGUE ..... Physiologie.

SECRÉTAIRE

M. G. CUVIER, I. ✿.

A MON CHER MAITRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR CHARLES LAPP,

PROFESSEUR DE CHIMIE ANALYTIQUE ET DE TOXICOLOGIE
DIRECTEUR DU LABORATOIRE DE PHYSICO-CHIMIE
A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
OFFICIER DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE

Hommage de profonde gratitude et respectueuse admiration.

A MES JUGES

MADAME S. LALLEMAND,

AGRÉGÉE ÈS-SCIENCES NATURELLES
CHEF DES TRAVAUX PRATIQUES
A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
CHARGÉE DU COURS DE PHARMACODYNAMIE

MONSIEUR LE PROFESSEUR P. CORDIER,

PROFESSEUR DE CHIMIE BIOLOGIQUE
A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
OFFICIER DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE

Témoignage de vive reconnaissance.

A MA MÈRE ET A MON PÈRE

Expression de mon ardent amour filial.

A MES FRÈRES, MA BELLE-SŒUR ET MA PETITE NIÈCE

Sentiments de complète affection.

A TOUTE MA FAMILLE ET A TOUS MES AMIS

En témoignage d'une amitié sincère.

A MADAME, MADEMOISELLE ET MONSIEUR E. TREILLE

(PHARMACIEN AUX MARTRES-DE-VEYRE (P.-de-D.)

Cette excellente famille, où j'ai eu l'heureuse fortune de passer deux inoubliables années.

En gage d'affectueux attachement et fidèle reconnaissance.

Avant-Propos

C'est moins pour perpétuer une vieille tradition que pour nous acquitter d'une véritable dette de reconnaissance que nous venons ici, avant d'exposer les résultats de notre travail, apporter le témoignage de notre gratitude à tous nos Maîtres soit pour l'enseignement fécond qu'ils nous ont légué, soit pour la compréhension bienveillante que nous avons toujours trouvée auprès d'eux.

Nous voulons tout d'abord adresser à notre cher Maître et Président de Thèse, M. le Professeur Ch. Lapp, l'expression de notre très vive et très respectueuse reconnaissance pour avoir bien voulu nous accueillir dans son laboratoire. Nous ne cesserons de conserver avec gratitude le souvenir de la haute autorité de son enseignement et des directives, qu'il nous a données, de la rare compétence avec laquelle il a orienté et facilité nos recherches, autant que des marques de confiance, d'estime et d'amitié qu'il nous a témoignées. Nous n'oublierons jamais ce que nous lui devons et nous tenons à l'assurer de notre entier dévouement et notre vive admiration.

Nous sommes heureux de remercier Madame Lallemand et M. le Professeur Cordier d'avoir bien voulu s'intéresser à notre modeste étude et de l'honneur qu'ils nous ont fait en consentant de faire partie du jury de cette thèse.

Nous désirons exprimer ici nos sentiments reconnaissants et notre attachement respectueux à notre vénéré Doyen, M. le Professeur A. Sartory et à tous nos Maîtres de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg auxquels nous associons également nos Maîtres de l'Université de Clermont-Ferrand.

Disons enfin combien nous sommes attachés à la France dont la cordiale hospitalité nous a été si sensible. Nous avons pleinement confiance en son relèvement prochain et l'espoir de la voir reprendre son rang précédent de grande nation lié au rayonnement intellectuel et scientifique.

INTRODUCTION

Les méthodes de dosage des sucres réducteurs peuvent être classées en macrométhodes qui vont de 100 à 10 milligrammes, semi-microméthodes qui vont de 10 à 0,1 milligrammes, et microméthodes pour 0,1 milligramme et au-dessous.

Ces méthodes sont basées essentiellement sur le pouvoir réducteur des sucres et une fois la réduction produite, des techniques chimiques rigoureuses et bien connues sont mises en jeu, afin de permettre un macro- ou un microdosage aussi exact que possible.

La difficulté de toutes les techniques tient dans l'opération essentielle de la réduction, opération en général difficile à suivre dans le détail, donc mal connue.

Toutes les méthodes sont soit volumétriques, soit colorimétriques. Depuis SOXHLET les méthodes pondérales ont été abandonnées. La plupart des auteurs préfèrent les techniques volumétriques.

Deux microméthodes classiques, celle de FOLIN-WU et celle de MESTREZAT sont colorimétriques.

L'avantage des méthodes colorimétriques étant la rapidité et une précision comparable aux méthodes volumétriques, nous avons mis sur pied, en premier lieu, une *macrométhode colorimétrique* de dosage des sucres réducteurs au moyen du réactif tartrate ferrico-potassique, étudié par Mlle DUBOIS dans sa thèse.

Pour appliquer cette technique aux liquides biologiques et en particulier aux urines, nous avons été obligés de rechercher l'action des défécants sur le réactif ferrique.

Nous avons ainsi rencontré l'acide picrique comme agent défécant et agent exaltant la réduction du réactif ferrique.

Nous avons été conduits ainsi à introduire une modification à la méthode de MESTREZAT, modifiée par FLEURY : au moyen du réactif complémentaire tartrate ferrico-potassique on obtient des colorations plus vives qui permettent une meilleure appréciation colorimétrique et permettraient d'abaisser la limite d'emploi de la réaction picrato-picrique de LEWIS et BENEDICT. Nous préconisons donc à la suite de nos recherches une nouvelle technique de *microdosage colorimétrique* des glucides.

Dans la Première Partie de ce travail nous énumérons les réactions colorées des sucres.

Dans la Deuxième les propriétés du réactif au tartrate ferrico-potassique en solution ammoniacale.

Dans la Troisième Partie nous exposons la technique de préparation des gammes colorées et les conditions de leur conservation.

Pour aborder l'application au dosage du sucre dans les urines, nous rappelons dans les Quatrième et Cinquième Parties l'opération de la défécation et l'action des défécants sur le réactif.

Dans la Sixième Partie, nous proposons une technique de défécation adéquate au réactif.

Dans les Septième et Huitième Parties, nous appliquons à la technique picrato-picrique de microdosage l'action adjuvante du réactif qui semble catalyser la réduction.

Nos conclusions résument l'ensemble de ces résultats.

Première Partie

RÉACTIONS COLORÉES DES SUCRES

Les réactions colorées des sucres sont en général qualitatives. La plupart sont soit très sensibles et fonctionnent pour une fraction de milligramme de sucre, soit caractéristiques de la nature du sucre ou des fonctions chimiques que la molécule contient.

C'est ainsi que nous rappellerons les réactions principales suivantes :

A. — Réactions qualitatives.

a) Réactions générales des sucres :

1. Lorsqu'on fait bouillir une solution de sucre avec une solution de potasse, le liquide se colore en jaune foncé (caramélisation).

2. Avec SO^4H^2 concentré, elle se colore rapidement en brun foncé.

3. Chauffée avec la phloroglucine et l'acide chlorhydrique concentré, elle donne une coloration rouge.

b) Réactions pour distinguer les sucres aldéhydiques des sucres cétoniques :

1. Réaction de Séliwanoff :

Trois centimètres cubes d'acide chlorhydrique dilué de son volume d'eau avec quelques milligrammes de sucre et 2 centimètres cubes de réactif résorcinique (1) ; une coloration rouge très nette se produit, ce qui indique le sucre cétonique.

2. Réaction de Berg :

Deux à trois centigrammes de sucre en solution concentrée sont additionnés de 10 cm3 d'eau de brome saturée à la température ordinaire et fraîchement préparée avec du brome pur. Le tout est placé dans un tube à essai, puis chauffé au bain-marie pendant dix minutes. On porte ensuite à l'ébullition le contenu du tube pour chasser le brome restant. La liqueur, parfaitement incolore, est additionnée de 10 cm3 de réactif obtenu en ajoutant à 100 cm3 d'eau distillée, quatre gouttes de perchlorure de fer à 45° B. et deux gouttes d'acide chlorhydrique à 22° B. Il se forme une coloration jaune brun qui confirme le sucre aldéhydique.

(1) Réactif résorcinique : faire dissoudre 2 grammes de résorcine blanche bien pure dans 100 cm3 d'eau et ajouter 1/2 cm3 de SO^4H^2.

3. Réaction de NEUMANN :

Dix gouttes d'une solution sucrée (pas trop concentrée) sont traitées dans un tube à essai avec un mélange de 5 cm3 d'acide acétique cristallisable et 5 cm3 d'une solution alcoolique d'orcine à 5 %. On porte à l'ébullition et on ajoute, goutte à goutte, de l'acide sulfurique concentré, jusqu'à coloration distincte. Le liquide se colore pour :

L'arabinose en rouge violet ;

Le xylose en violet bleu ;

Le glucose en brun rouge.

4. Réaction de ROSENTHALER :

On chauffe la solution sucrée avec la vanilline et l'acide chlorhydrique. La coloration rose indique des cétoses.

B. — RÉACTIONS QUANTITATIVES.

La méthode de FOLIN-WU ne procède pas d'une coloration donnée directement par le sucre. Essentiellement, la réduction porte sur une liqueur cupro-alcaline spéciale et c'est le dosage du produit de la réaction de l'oxydule de cuivre formé sur le réactif phospho-molybdique qui fait l'objet d'une mesure colorimétrique. La méthode de FOLIN-WU n'est donc qu'une méthode colorimétrique indirecte à laquelle s'attachent toutes les difficultés inhérentes à la réduction du sel cuivrique par les sucres.

A notre connaissance, une seule réaction colorée directe due au sucre lui-même a fait l'objet d'une technique colorimétrique, c'est la réaction picrato-picrique, employée pour la première fois par LEWIS et BENEDICT (9). Modifiée par BENEDICT et OSTERBERG (3), MESTREZAT et Mlle GARREAU (10), finalement rendue classique par FLEURY (6) et appliquée au liquide céphalo-rachidien. Nous rappelons ici cette technique à laquelle nous reviendrons plus tard quand nous exposerons une microméthode, dérivée de celle de MESTREZAT.

Nous n'avons pas jugé utile de rappeler dans les détails la technique du dosage de MESTREZAT, parfaitement bien exposé dans « les Techniques de chimie biologique » du Professeur S. FLEURY (6). Nous ne donnons que la remarque suivante : « Cette méthode donne des « résultats avec une approximation de + ou — 4 % pour les liquides « céphalo-rachidiens contenant une quantité de glucose comprise entre « 0 gr. 30 et 0 gr. 80 par litre.

« Pour les quantités inférieures à 0 gr. 30, il est nécessaire d'opérer « avec un témoin plus concentré à 0 gr. 75 pour mille par exemple, « si l'on veut que les résultats conservent une exactitude suffisante.

« *Résultats.* — A l'état normal, la glycorachie est comprise entre « 0,48 et 0,60. Dans la méningite chronique, elle est un peu abaissée

« (0,35 à 0,45). Dans le cas de méningite tuberculeuse et aiguë, on ne « trouve plus que des traces de glucose.

« On trouve des valeurs au-dessus de 0,70 chez les sujets hyper- « glycémiques. D'après certains auteurs, ces valeurs élevées se trouve- « raient aussi au cours des encéphalites épidémiques. »

La technique de MESTREZAT est d'ailleurs susceptible d'être appliquée à une *macrométhode* où entrent en jeu 2 cm3 5 de liquide biologique contenant 10 milligrammes environ de glucose (par cm3 : 0 mgr. 5 environ), puis à une *microméthode,* permettant de faire des mesures sur 0 cm3 1 de liquide, c'est-à-dire sur 0 mgr. 05 de glucose. La précision des mesures pourrait atteindre 0 gr. 2 par litre.

La méthode est parfaitement régulière et le serait plus que la méthode cuprique. L'albumine des humeurs est bien déféquée. Certains réducteurs, tels que la créatine, la créatinine, des polyphénols, l'acide urique donnent la réaction picrato-pricrique, donc fausseraient le dosage. D'après MESTREZAT, la réaction d'alarme décelant la présence de ces corps se produirait à *froid,* ce qui n'est pas le cas pour le glucose.

Dans la majorité des cas les humeurs de l'organisme ne contiennent ces substances que rarement dans des cas pathologiques connus (imperméabilité rénale, acidose) et ne sont en général pas gênantes. La défécation de ces substances exige le réactif de PATEIN-DUFAU.

C'est sans doute la raison pour laquelle la méthode ne convient pas pour le dosage du glucose dans les urines.

Deuxième Partie

LE RÉACTIF TARTRATE FERRIQUE

1. — Le tartrate ferrico-potassique en solution ammoniacale.

Parallèlement au complexe tartrique K Na cuivrique (Liqueur de Fehling, Bertrand, etc...), le complexe tartrique K Na ferrique est susceptible d'être réduit par le glucose à condition d'opérer en solution ammoniacale.

Mlle Dubois (5) a entrepris l'étude de cette réduction et a montré qu'elle est susceptible par sa régularité même de faire l'objet d'une méthode colorimétrique soit par l'emploi du colorimètre ou du photocolorimètre, soit par l'établissement de gammes de concentration dans lesquelles la teinte jaune clair de la solution initiale se transforme en teinte brune plus ou moins foncée selon la proportion du sucre. Elle a montré en outre par la comparaison du glucose, du lévulose, de l'arabinose, du galactose, du lactose et du maltose que chaque sucre possède un pouvoir réducteur particulier dont la valeur diffère nettement pour certains sucres de ce qu'il est dans le cas de la Liqueur de Fehling.

Réactif Tartrate K Na Fe :

Nous l'avons préparé comme l'indique Mlle Dubois dans sa thèse (p. 35) :

Tartrate de fer et de potasse.....		1 gr. dissout dans
Eau distillée	q. s. p....	100 cm3
Acide tartrique		8 gr.
Carbonate de soude cristallisé.....		40 gr. dissout dans
Eau distillée	q. s. p....	80 cm3

Par sa composition, cette solution se rapproche de la Liqueur de Fehling. Celle-ci, en effet, contient un tartrate complexe de K Na Cu, notre solution est un tartrate complexe de K Na Fe.

2. — Stabilité du réactif.

Pour commencer, nous avons préparé trois solutions qu'on a mises en flacons blancs ordinaires. Ils étaient placés dans le placard du labo-

ratoire à la lumière. Le 18 Décembre 1940, nous avons fait les observations suivantes :

Flacon N° 1 du 5 Novembre 1940 : assez trouble.
Flacon N° 2 du 12 Novembre 1940 : flocons faibles au fond.
Flacon N° 3 du 15 Novembre 1940 : très faible dépôt.

Les flacons ont reçu le 18 Décembre 1940 quelques centigrammes de thymol. Trois semaines plus tard, les liqueurs des 3 flacons ont été filtrées et sont depuis restées limpides et stables, sauf celle du flacon 3, qui était très faiblement trouble en Avril 1941. Elle a été filtrée de nouveau et est restée claire et stable. La couleur jaune très clair reste fixe.

3. — Mode de réduction du complexe tartrique K Na Fe.

Additionnée de glucose et portée à l'ébullition la liqueur ferrico-potassique ne donne rien. C'est en ajoutant de l'ammoniaque que Mlle Dubois a observé le phénomène suivant : *Pour des doses de plus en plus grandes de sucre, on obtient des colorations de plus en plus foncées.* L'ammoniaque seul, sans sucre, est sans action sur la liqueur ferrique. On doit donc attribuer la coloration foncée à l'action du glucose sur le complexe tartrique ferrico-potassique en milieu ammoniacal.

Ce complexe a été étudié dans le but d'en tirer une méthode colorimétrique nouvelle de dosage des sucres : « Pour un volume total de « 20 cm3 contenant 1 cm3 de réactif ferrique et 10 gouttes d'ammo- « niaque, la quantité de sucre ajoutée varie de 5 à 50 mgr., la teinte « est régulière, semble stable pendant plusieurs heures et aucun sédi- « ment ne se produit même après plusieurs jours ».

A froid, la réduction est insensible. Pour la provoquer, il est nécessaire de maintenir une température voisine de l'ébullition. Au bain-marie bouillant, la teinte ne change plus et la réduction est complètement terminée au bout de 15 à 20 minutes. Une rampe de 10 tubes est garnie de tubes à essai identiques. On mesure exactement et à la pipette dans chaque tube. 1 cm3 de réactif ferrique, on ajoute 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 cm3, etc... de solution sucrée à 1 %. On ajoute dans chaque tube à essai dix gouttes d'ammoniaque et on complète ensuite le volume à 20 cm3.

Différents sucres ont donné des gammes très régulières de réduction comme avec le glucose mais avec des intensités différentes témoignant ainsi des pouvoirs réducteurs propres à chaque sucre.

4. — Applications pratiques : Méthode de la fourchette.

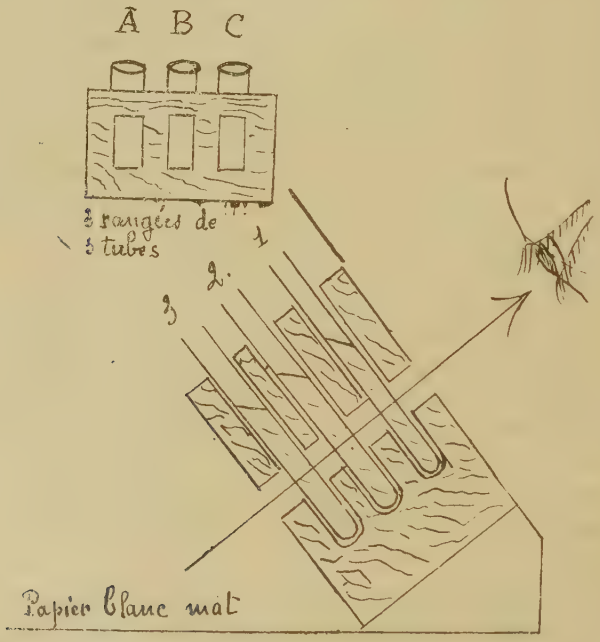
Mlle Dubois s'est préoccupée de savoir si la simple méthode de la fourchette pouvait donner un dosage assez précis.

La technique consiste à comparer la coloration produite par un volume donné d'une solution sucrée inconnue à une gamme colorée formée de tubes de concentrations croissantes et établie dans les mêmes conditions avec une liqueur titrée. L'erreur commise sur la mesure est de 6 %.

Pour augmenter la précision des mesures colorimétriques, nous avons employé un comparateur de Walpole.

On sait qu'il consiste en un bloc de bois plein percé de trois séries de trous ronds 1, 2, 3 (soit 9 trous en carré). Trois trous carrés de dimension plus petite traversent les précédents. L'œil de l'observateur peut comparer trois plages colorées par le passage de la lumière à travers les solutions 1, 2, 3. Pour avoir de belles plages larges, il faut deux tubes pleins de liquides, l'un pouvant être plein d'eau pure.

Le tube 1 contient la solution colorée par le réactif, le tube 2 l'eau pure ou la solution colorée avant la réaction (urine), le tube 3 (parfois vide) contient le réactif avant la réaction, ou toute autre solution complémentaire.



Si A, B, C sont les trois séries de tubes dans le sens des rayons lumineux, on place dans A et C les tubes étalons, par exemple 12 et 15 mgr. et en B le tube à examiner. On peut évaluer par interpolation, la concentration cherchée, soit 13 s'il se rapproche de A, ou 14 s'il se rapproche de C.

Il est bon de placer le comparateur derrière un écran large pour que le jugement de l'œil ne soit pas faussé par de la lumière extérieure vive ou colorée.

En inscrivant sur chaque tube le nombre de milligrammes de sucre qui ont produit la coloration, on a une mesure directe ; il suffit pour rapporter au litre de tenir compte du volume de la prise d'essai. La latitude est grande car on part de 1 cm3 de réactif ferrique, un 1/2 cm3 d'ammoniaque et l'on porte le volume total à 20 cm3, on dispose donc de 18 cm3 5 pour la prise d'essai.

Troisième Partie

TECHNIQUE DE PRÉPARATION DES GAMMES

1. — Technique.

Une rampe à 12 tubes est garnie de 12 tubes à essai identiques. On mesure exactement et à la pipette dans chaque tube à essai 1 cm3 du réactif ferrique. On ajoute ensuite 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; etc... jusqu'à 5 cm3 5 d'une solution glucosée à 1 %, sauf dans le tube N° 1 qui sert comme témoin. On met ensuite dans chaque tube dix gouttes d'ammoniaque et on complète le volume jusqu'à 20 cm3 avec de l'eau distillée. Après avoir bien agité on place le faisceau des tubes dans un bain-marie, le niveau extérieur de l'eau dépassant un peu le niveau des solutions dans les tubes. On maintient une ébullition douce et régulière pendant 20 minutes. On retire les tubes, les essuie et la rampe des tubes ainsi obtenue présente selon les propriétés réductrices des sucres une gamme de teintes remarquablement régulière pour les doses allant de 10 à 55 milligrammes.

Dans le tube N° 1 avec 0 mgr. de sucre et tube N° 2 avec 5 mgr. de sucre, on n'a pas obtenu de réduction ou une réduction incomplète. Au fond des tubes, le réactif a produit un dépôt rouge gélatineux, sans doute d'hydrate ferrique.

La teinte régulière part donc de 10 mgr. de glucose au minimum.

Nous avons ainsi successivement préparé une vingtaine de gammes qui, comparées avec les précédentes, donnaient chaque fois les mêmes teintes.

2. — Conservation, Stabilité, Sensibilité.

Ayant constaté une légère variation de teinte au bout de deux semaines, nous avons déterminé par l'expérience les conditions de stabilité des gammes.

L'une a été tout de suite fermée au liège, puis paraffinée et laissée à la lumière, à la température du laboratoire dans un placard vitré.

L'autre a été fermée de même mais laissée à l'obscurité complète dans un lieu frais.

La troisième a été laissée ouverte à l'air libre et à la lumière du laboratoire. Au bout d'un mois, nous avons fait les observations suivantes :

La rampe 3 laissée ouverte et à la lumière a donné des cultures en surface et au fond du tube. Une autre rampe identique vieille de deux semaines, laissée ouverte et à la lumière n'a pas donné de cultures microbiennes mais une baisse générale de la teinte au bout de ces 15 jours.

Les deux autres rampes, l'une à l'obscurité et au froid, l'autre à la lumière dans le placard, mais toutes deux bouchées à la paraffine, n'ont présenté ni altération de teinte, ni dépôt, ni cultures microbiennes.

Nous avons fait une nouvelle gamme et après la réduction, au lieu de boucher à la paraffine nous avons fermé les tubes à essais au chalumeau. Au bout de six semaines, nous avons pu constater que cette rampe se conserve aussi bien que celles bouchées à la paraffine.

Enfin, nous avons fermé les tubes au chalumeau avant de les mettre au bain-marie. Après la réduction, les teintes correspondaient aux précédentes et la conservation était aussi bonne que dans les autres cas.

C'est cette dernière gamme que nous avons gardée comme gamme étalon. 5 mgr. de glucose donnant toujours un dépôt brun-rouge, nous avons donc commencé la gamme à 10 mgr. allant jusqu'à 130 mgr. Au-dessus, la teinte est trop foncée pour donner des résultats exacts.

3. — Altération de la teinte par l'oxygène de l'air.

Comme nous avons tout lieu d'attribuer cette coloration, d'après Mlle Dubois, au passage de tartrate ferrique en tartrate ferreux, nous avons pensé que l'oxydation par l'air pourrait faire rétrograder la réduction — à la manière de la Liqueur de Fehling décolorée qui redevient bleue à l'air.

Nous avons comparé une gamme de tubes ouverts à l'air pendant 3 semaines à une gamme tenue fermée deux mois et à une gamme fraîchement préparée.

Les observations ont été faites sous la forme suivante : le tube de 35 mgr. frais a la même teinte que le tube de 35 mgr. bouché et paraffiné et que le tube de 50 mgr. laissé ouvert.

La baisse de la teinte ferait passer les mesures avec de telles gammes de 50 à 35 mgr. donc introduit un écart énorme. La variation est assez régulière cependant pour faire l'objet d'un coefficient. Il faudrait multiplier les chiffres obtenus par le coefficient moyen 0,72 pour avoir le titre vrai en glucose.

Quant à la gamme de tubes tenus bouchés et paraffinés, elle n'avait pas varié. Il est donc nécessaire de maintenir les tubes bien à l'abri de la réoxydation du tartrate de fer réduit par l'oxygène de l'air.

L'expérience montre qu'il n'est pas nécessaire de sceller les tubes ; de bons bouchons paraffinés suffisent parfaitement.

4. — Influence de la lumière.

Durant les mois d'hiver et dans un laboratoire assez sombre, nous n'avons pas observé de variation de teinte bien nette. Cependant, au début du mois de mai nous avons aperçu que la gamme étalon avait légèrement baissé de teinte, car elle était placée à côté de la fenêtre et parfois en plein soleil.

Nous avons alors comparé les différentes gammes et voici le résultat : Tableau N° 1.

Tableau N° 1

GAMMES

A la lumière					A l'obscurité	
Fraîche	Scellée 3 mois	c_1	Paraffinée 5 mois	c_2	Paraffinée 5 mois	c_3
mgr.	mgr.		mgr.			
5	8	0,62		0,5		
6	10	0,60				
8	15	0,53				
10	17	0,59	15	0,67		
12	18	0,67	20	0,60		
14	20	0,70				
16			25	0,69		
17	25	0,68			20	0,85
23	35	0,65	28	0,82		
27	40	0,67				
28			30	0,94		
32	42	0,76				
33			40	0,82	35	0,94
35	43	0,81			40	0,88
43	45	0,95	45	0,95		
46	50	0,92	50	0,92		
50	55	0,91	55	0,91		
52	60	0,86				
55	63	0,87				
75	65	0,87				

Il y a, dans tous les cas, une diminution de la teinte qui se traduirait pratiquement dans le dosage par un chiffre *trop fort*. Les colonnes C_1, C_2, C_3 contiennent les coefficients de correction par lesquels il faut multiplier les chiffres *lus* pour avoir les chiffres *vrais*.

En suivant les colonnes on se rend compte :

a) que l'influence de la lumière est plus grande sur les solutions plus foncées ;

b) que les gammes en tubes scellés ne se gardent pas mieux que les gammes en tubes bouchés au liège et paraffinés ;

c) que le coefficient de correction est trop différent aux basses et aux hautes concentrations pour qu'on puisse en faire un emploi régulier ;

d) que la gamme des tubes tenus à l'obscurité s'est conservée d'une manière satisfaisante pendant cinq mois ; coefficient de correction moyen : 0,90.

D'où nous tirons la conclusion que les gammes s'altèrent lentement et doivent être renouvelées tous les quatre mois à peu près. Pour économiser le matériel ce n'est pas la peine de sceller les tubes au chalumeau, étant donné que les gammes bouchées au liège paraffiné se gardent aussi bien. Il est préférable de conserver les gammes à l'obscurité et au frais autant que possible.

5. — Précisions de dosages du glucose par la présente méthode colorimétrique.

La gamme étalon établie, nous avons dosé des solutions de glucose par le réactif ferrique et la méthode de la fourchette. La technique consiste à comparer la coloration produite par un volume donné d'une solution inconnue à la gamme étalon établie dans les mêmes conditions.

Il est facile de voir à quel tube de la gamme étalon le tube à étalonner correspond.

Pour faciliter ces comparaisons, nous avons employé le comparateur de Walpole décrit précédemment.

Pour doser le glucose nous n'avons pas pris une solution inconnue, mais 4 tubes contenant 50, 40, 30, 20 mgr. de glucose. Afin d'éprouver la technique, nous avons en même temps fait un titrage par la méthode de Bertrand.

En retrouvant le chiffre cherché, nous avons refait ces dosages à intervalles fixes, c'est-à-dire chaque mardi pendant 5 semaines pour voir si la gamme reste constante, ce que l'expérience a pleinement confirmé à moins de 3 % près.

6. — Influence d'un délai sur la précision du dosage de glucose.

Sur une rampe vieille de 3 jours nous avons dosé le glucose avec 4,5 ; 3,5 ; 2,5 cm3 d'une solution à 1 %. Nous avons trouvé le chiffre cherché. Les expériences refaites 3 jours après avec la même solution ont donné les mêmes résultats. Ceci montre que la teinte est assez stable pour que le dosage garde sa précision plusieurs jours après le traitement des tubes au bain-marie. Cette observation laisse à penser que notre technique peut être utile dans le cas de dosages à distance, car il est toujours facile de faire un chauffage au bain-marie partout ; on peut ensuite faire la mesure au laboratoire avec la gamme.

7. — Discussion de la précision et des limites d'emploi.

La solution sucrée d'une gamme fixe va de

1 cm3 de solution de glucose à 1 % ..... 10 mgr. de sucre
à 10 cm3 de solution de glucose à 1 % ..... 100 mgr. de sucre

Il faut donc faire 20 tubes de 1 cm3 à 10 cm3 de glucose à 1 %, ajouter le réactif ferrique, les mettre au bain-marie et fermer. En déduisant 1 cm3 de réactif ferrique et 0 cm3 5 NH^4OH on dispose de 18 cm3 5 de liquide.

Les urines diabétiques commencent de quelques grammes par litre jusqu'à 50 gr. pour mille au maximum. La dose la plus faible de 2 gr. par litre correspond à 2 mgr. par cm3. La sensibilité du réactif ferrique commence à 10 mgr., il faut donc prendre au moins 5 cm3 d'urine, ce qui est très facile. On pourrait faire des dosages à partir de 10 mgr. de sucre dans 18 cm3 5 d'urine = 0 gr. 54 par litre, concentration bien en dessous de la poussée de sucre dans l'urine, normale après un bon repas au début de l'assimilation intestinale.

8. — Comparaison de différents sucres.

Lactose.

Nous avons fait deux rampes dans les mêmes conditions, l'une avec des doses croissantes de solution de glucose à 1 %, l'autre avec des doses croissantes de solution de lactose à 1 %. Nous avons constaté que d'une manière générale la teinte produite par le lactose est plus foncée que celle produite par le glucose : ainsi le tube contenant 40 mgr. de lactose avait la même couleur que celui contenant 50 mgr. de glucose. La correspondance des teintes est donnée par le Tableau N° 2.

Tableau N° 2

GAMMES FRAICHES		Coefficient de conversion
en Glucose	en Lactose	
mgr.	mgr.	
50	40	0,80
45	35	0,77
40	30	0,75
35	25	0,71
27	20	0,74
25	20	0,80
20	15	0,75
15	10	0,67
		Moyenne : 0,75

La colonne du coefficient de conversion montre que si l'on veut *doser le lactose* avec une rampe construite avec du *glucose,* il faut multiplier le chiffre lu par le coefficient 0,75 pour avoir le poids de lactose contenu dans la prise d'essai.

Or, on sait que le lactose peut se trouver dans l'urine de femmes en gestation, chez les nouvelles accouchées et chez les nourrices.

L'identification du lactose par la lactosazone (8) peut donc, sans difficulté être suivie dans notre technique par un dosage colorimétrique avec une gamme de glucose.

Lévulose.

La réduction par le lévulose était peu différente de celle du glucose.

Le coefficient de conversion 0,82 permet d'*exprimer en lévulose* la quantité de sucre contenu dans une prise d'essai, mesurée sur une gamme de tubes construite avec du *glucose.*

Action du Saccharose sur le Réactif ferrique.

Nous avons répété l'expérience avec le saccharose en construisant une rampe de tubes avec des concentrations croissantes depuis 5 mgr. jusqu'à 60 mgr. de saccharose.

Nous n'avons, pour aucun tube, observé de teinte brune de réduction, mais un dépôt floconneux, léger, d'aspect colloïdal, de couleur brun-rouge, alors que la liqueur surnageante est décolorée.

Nous en avons conclu que sur ce complexe ferrico-potassique *le saccharose est sans effet réducteur,* la précipitation de l'hydrate ferrique étant tout à fait semblable à l'effet de la chaleur seule à la température du bain-marie.

Notre technique est donc aussi apte que la réduction cuivrique — cuivreux au dosage successif du saccharose et des sucres réducteurs, en chimie alimentaire par exemple.

Faute de temps, nous n'avons cependant pas pu contrôler cette affirmation par des expériences qui, à notre avis, doivent être favorables à notre point de vue.

Quatrième Partie

LA QUESTION DE LA DÉFÉCATION

1. — Préliminaires.

Pour tirer parti de la réaction colorée des sucres réducteurs sur le réactif tartrate ferrico-potassique ammoniacal, nous avons étendu nos recherches à son application à la chimie biologique pour le dosage du glucose dans les liquides biologiques : urines et diverses sérosités.

Un premier essai consistait à faire des solutions de glucose et de lactose à 1 % dans de l'urine normale et essayer l'action de ces solutions sur le réactif.

Les résultats ont été confus : sans doute, la réaction de réduction subsiste encore mais gênée ou compliquée. Il nous a semblé que le réactif ferrique fonctionnait parfois comme un *véritable réactif défécant* sur les constituants de l'urine.

Dans ces conditions, une défécation préalable était nécessaire. Nous avons recherché l'action des défécants sur la solution aqueuse, puis sur la solution aqueuse glucosée, puis sur l'urine glucosée. Le résumé de ces recherches fera l'objet de la Cinquième Partie. Il nous paraît utile de résumer les faits les plus importants en ce qui concerne la très difficile opération de la défécation.

2. — Action des réactifs défécants.

L'élimination des substances perturbatrices se fait en général par précipitation, au moyen des réactifs défécants. Or, l'expérience montre que si l'élément perturbateur et ultérieurement l'agent précipitant sont séparés, après filtration on ne retrouve dans le filtrat *qu'une partie* des sucres à doser : le reste a été retenu par adsorption sur le précipité.

Le phénomène, d'ailleurs général, de la fixation de molécules en solution vraie sur les particules colloïdales en voie de floculation ou sur les fines particules amorphes ou micro-cristallines au début de leur formation, constitue l'un des plus importants obstacles aux dosages de la chimie alimentaire et de la chimie biologique.

Des travaux systématiques ont été entrepris pour évaluer les pertes par défécation, en particulier par Mlle Bochner (4). Les expériences portent sur les sucres dans les liquides albumino-glucosés, dans l'urine, le vin, le lait, le sang et une macération aqueuse de drogue ; le dosage est fait par la méthode de Bertrand.

Les résultats qui nous intéressent sont inclus dans le Tableau N° 3.

TABLEAU N° 3

LIQUIDE INITIAL	DÉFÉCANT	ERREUR EN %
Solution albumino-glucosée.	Sous-acétate de plomb	— 13,6
—	Acétate neutre de plomb..	— 3
—	Sulfate acide de mercure...	— 1,8
Urine glucosée	Sous-acétate de plomb	— 15
—	Réactif de Patein-Dufau ...	— 15
—	Acétate de zinc	— 9
—	Ferrocyanure de cuivre	— 7
—	Acétate neutre de plomb...	— 3
—	Acétate de mercure	— 3
—	Sulfate de mercure	— 3

L'action des défécants se traduit donc par des pertes allant selon les circonstances de 1,8 à 15 %.

2. — ETUDE SYSTÉMATIQUE DE L'ENTRAINEMENT DES SUCRES.

S'il est un fait expérimental que la formation d'un précipité produit un entraînement partiel du sucre dissout, le phénomène peut être exagéré dans certains cas, comme l'a montré SALKOWSKI en 1879 ; la précipitation de l'hydrate de cuivre (ou de sulfates plus ou moins basiques) par la soude à partir du sulfate de cuivre entraîne le sucre présent dans la solution : dans certaines circonstances cet entraînement peut être total.

En éliminant ainsi le glucose des urines diabétiques, VAN SLYKE a pu doser l'acide β oxybutyrique.

BISSINGER a utilisé cet entraînement pour isoler le glucose et le lévulose après régénération à partir du précipité.

AMBERT (1) a étudié systématiquement le phénomène en produisant la précipitation par la baryte et non par la soude.

Les conditions de molarité données par SALKOWSKI sont les suivantes : pour une molécule de glucose, 5 molécules SO^4 Cu et 11 molécules Na OH. L'entraînement atteint alors son maximum.

Avec la baryte, les conditions de molarité sont : pour une molécule de glucose 7 de SO^4 Cu et 7,7 de baryte.

Le temps intervient.

La meilleure adsorption se fait en solution diluée et par addition de SO^4 Cu dans le sucre en solution alcaline. L'ion cuivrique oxyde d'ailleurs le sucre même à 15°, il ne faut donc pas prolonger le contact.

La meilleure technique est l'affusion alternative de SO^4 Cu et de baryte dans le mélange refroidi ; la baryte est éliminée par un courant de CO^2 et centrifugation.

Un phénomène inverse peut se produire, c'est le maintien en solution de l'hydroxyde cuivrique par la présence d'un polyol (peptisation).

Outre le sucre, l'alcali se fixe en partie sur le précipité.

Retenons ici les conditions de l'entraînement maximum : la quantité d'alcali fixé est d'abord proportionnelle à la quantité de sucre jusqu'au maximum au delà duquel l'alcali continue à se fixer. La peptisation gênante est diminuée en forçant la proportion de l'alcali ou en précipitant le complexe dissous après avoir séparé le précipité. Il faut alors neutraliser. L'opération de précipitation doit alors se faire en deux temps. L'extraction des sucres entraînés est possible par une centrifugation spéciale.

Le lévulose et le saccharose sont difficilement entraînables car ils provoquent une peptisation intense.

Ambert a ensuite appliqué cette méthode à des recherches sur le carbone indosé urinaire. Il a procédé tout d'abord à la recherche d'un défécant sans entraînement de sucre. Il rejette l'acétate basique de plomb comme entraînant une petite partie du sucre. L'auteur adopte le réactif de Patein-Dufau ou le sulfate mercurique-baryte.

L'auteur indique que ces défécants respectent les matières glucidiques, mais entraînent 30 à 40 % des matières organiques primitives, 73 % d'azote total, 64 % de carbone total, 72 % d'urée et 55 % de chlorures.

Le filtrat est employé pour l'entraînement des glucides par le système SO^4 Cu—Baryte, 85 % sont dans le précipité, 15 % dans la liqueur. Ambert en tire d'intéressantes conclusions sur la nature des glucides de l'urine.

4. — Généralisation des recherches sur l'entrainement des sucres.

Les études d'Ambert ont été reprises, pour les généraliser par Fleury et Courtois (7) ; ils ont montré que la réaction de Salkowski se manifeste pour tous les hydroxydes des métaux lourds en milieu alcalin entraînant les glucides et les polyols.

Au point de vue des alcalis, les meilleurs entraînements sont obtenus avec la baryte, puis avec l'ammoniaque.

Au point de vue de l'anion du sel, les acétates donnent de meilleurs résultats que les nitrates.

Au point de vue du métal, le fer se classe en tête de la série.

Les auteurs ont constaté que la redissolution des précipités est un phénomène fréquent. L'activité des hydroxydes diminue avec le temps.

La vitesse de l'évolution du précipité est un facteur qui joue dans le pouvoir fixateur des hydroxydes métalliques.

La redissolution du précipité ou peptisation est causée par la production d'un hydrosol formé d'hydroxyde et de sucre stable seulement en présence d'un excès d'alcali.

Les auteurs terminent leur mémoire en précisant les conditions à remplir pour obtenir dans les cas du glucose et du mannitol un entraînement total : glucose par l'acétate ferrique et la baryte, glucose par l'acétate de plomb et l'ammoniaque ; mannitol par le nitrate ferrique et la baryte. Par ces techniques, l'entraînement atteint 99 %.

5. — Etude comparative des microdosages classiques.

Un important travail de comparaison a été entrepris par Back (2) sur les techniques suivantes :

Pour la défécation :

— La méthode de Michaelis, dérivée de celle de Bertrand, emploie l'hydrate ferrique et le sulfate de magnésium : erreurs de — 5 à — 9 % ;

— La méthode de Folin-Wu emploie le réactif tungstomolybdique en milieu sulfurique : erreurs de + 5 à + 9 % ;

— La méthode de Fontès et Thivolle emploie le tungstate de soude et l'acide sulfurique 2/3 normal : erreurs de 0 à + 4 % ;

— La méthode de Bang emploie l'acétate d'urane et l'acide chlorhydrique : erreurs de — 6,5 à + 6 % ;

— La méthode de Hagedorn et Jensen nécessite le sulfate de zinc et la soude caustique : erreurs de — 6 à + 2,8 % ;

— La méthode de Baudouin et Lewin emploie le réactif nitro-mercurique, puis la soude normale : erreurs de — 8 à + 3,7 %.

L'auteur de cette recherche arrive à la conclusion qu'aucune méthode ne peut donner des mesures rigoureuses : *les erreurs en effet varient de 9 % par excès à 9 % par défaut.*

Si l'on songe cependant que le liquide en expérience est de l'ordre du centimètre cube et le glucose dosé de l'ordre du demi-milligramme, on se rend compte que ces techniques, quelles que soient leurs imperfections, conservent une grande valeur.

En clinique, où un chercheur emploie en général une seule technique qu'il connaît bien et qu'il met en jeu avec sûreté, ces variations interviennent beaucoup moins, le coefficient d'erreur personnelle expérimentale restant malgré tout nettement inférieur aux variations physiologiques ou pathologiques que l'on se propose de déceler.

6. — Conclusions.

Il ressort de tout cet ensemble important de recherches que nous venons de résumer qu'il est très difficile d'échapper à des pertes considérables quand on veut faire précéder le dosage des glucides par une opération presque toujours nécessaire de défécation.

Dans crtains cas, comme l'ont montré Fleury et Courtois, l'entraînement peut être total ; dans la majorité des cas et en particulier pour les microdosages l'erreur peut atteindre parfois 10 %.

Les métaux lourds, le fer, le plomb, entraînent de fortes erreurs par la défécation. Il semble que le meilleur défécant soit le mercure.

Cependant, il ne faut pas perdre de vue que l'élimination du défécant peut introduire d'importantes causes d'erreurs supplémentaires si cette élimination est longue et difficile, ce qui est précisément le cas du mercure.

Nous nous sommes donc préoccupés de rechercher quelle est l'action des agents défécants sur le réactif tartrate-ferrico-potassique en milieu ammoniacal.

Cinquième Partie

ACTION DES DÉFÉCANTS SUR LE RÉACTIF FERRIQUE

Ayant ainsi résumé les études antérieures sur les défécants et montré la très grande complexité du problème, nous avons recherché l'action des principaux défécants classiques sur de l'urine normale chargée d'une quantité connue de glucose.

Nous avons employé l'acétate neutre de plomb (Réactif de Courtonne), le sous-acétate de plomb (Extrait de Saturne), le nitrate mercurique (Réactif de Patein-Dufau), le sulfate acide de mercure (Réactif de Denigès), l'acétate de zinc (solution au 1/10e), le tungstate de sodium (solution au 1/10e), l'acide phosphotungstique, l'acide trichloracétique (solution au 1/4) et l'acide citro-picrique (Réactif d'Esbach).

Nous avons résumé dans le tableau N° 4 le réactif éliminant, la nature de la solution qui subsiste avec ses défauts, les substances éliminées.

Tableau N° 4

Réactif	Eliminant	Nature de la solution qui subsiste	Défaut	Substances éliminées
Réactif de Courtonne	Carbonate ou sulfate de soude	Présence de plomb, réaction alcaline	Fausse le dosage colorimétrique	Ne précipite pas les conjugués glycuroniques, les gommes du groupe arabique, des substances lévogyres réductrices, des albumoses peptonées, quelques albuminoïdes, dérivés azotés, bleu de méthylène.
Extrait de Saturne avec ammoniaque	Carbonate ou sulfate de soude	Présence de plomb, réaction alcaline	Fausse le dosage colorimétrique	Do. Mais précipite les conjugués glycuroniques.
Réactif de Patein-Dufau	Zinc	Nitrate de zinc	Fausse le dosage par cuprométrie	Ne précipite pas les conjugués glycuroniques, élimine bien les albuminoïdes, l'urée, l'acide urique, la créatinine.

Réactif	Eliminant	Nature de la solution qui subsiste	Défaut	Substances éliminées
Réactif de Denigès	Carbonate de baryum, sulfate de sodium et zinc pulvérisé	Sulfate de zinc	Fausse le dosage des sucres hydrolysables	Défèque bien le sang et les aliments
Tungstate de soude		Réaction neutre		Défèque bien le sang
Acide phosphotungstique		Réaction fortement acide		Défèque bien les albumoses et les peptones
Acide trichloracétique		Réaction fortement acide		Défèque bien le sang
Acide citropicrique		Réaction fortement acide		Défèque bien le lait

1. — Action des défécants sur des solutions aqueuses de glucose.

A. — *Dosage par la méthode de* Bertrand.

D'une solution aqueuse de glucose à 1 % nous avons pris 4 cm3 (= 40 mgr.), 5 cm3 eau distillée et 1 cm3 de défécant, sauf pour le réactif de Patein-Dufau, dont on a ajouté 50 %. Après filtration, nous avons ajouté l'éliminant et filtré de nouveau en complétant le volume avec de l'eau distillée jusqu'à 15 cm3.

Le dosage du sucre par la méthode de Bertrand a été effectué comme suit :

On prend 10 cm3 de la liqueur ci-dessus. Les 15 cm3 contenant 40 mgr. de glucose, les 10 cm3 contiennent 26 mgr. 6 de glucose ; ils correspondent à 52 mgr. 5 de Cu. Le titre de la solution de permanganate de potasse est :

10 cm3 correspondent à 9,563 mgr. de Cu

10 cm3 de liqueur filtrée correspondent à

$$\frac{52,5}{9,563} = 5 \text{ cm3 } 5 \text{ de } MnO^4 K$$

Les résultats sont contenus dans le Tableau N° 5.

La perte de glucose due à la défécation varie de 2 à 11 %, en général par défaut. Le tungstate de soude et le réactif de Denigès donnent des erreurs par excès.

Tableau N° 5

	Défécant	Eliminant	cm3 MnO^4 K trouvé	Sucre retrouvé	Erreur
1.	Courtonne	SO^4 Na^2	5,4	98	— 2
2.	Saturne	SO^4 Na^2	4,9	89	— 11
3.	Acétate de zinc.....	—	4,95	90	— 10
4.	Tungstate de soude	—	5,75	104	+ 4
5.	Acide trichloracétique	—	—	—	—
6.	Réactif d'Esbach ...	—	5,15	93,5	— 6,3
7.	Acide phosphotungstique	—	5,05	92	— 8
8.	Réactif de Denigès..	Zinc	5,95		
9.	Réactif de Patein-Dufau	Zinc	5,4	109 98	+ 9 — 2

Le sucre retrouvé varie de 90 à 109 %.

B. — *Dosage par le réactif ferrique.*

Le dosage par le réactif ferrique est conduit comme suit : on prend 3 cm3 de la liqueur filtrée qui correspond à 8 mgr. de glucose. Après la réduction la couleur n'est pas assez intense pour permettre un dosage.

On sait que le traitement du réactif ferrique au bain-marie produit en l'absence de corps réducteur, un précipité d'hydrate ferrique qui se rassemble bien au fond du liquide tout à fait décoloré.

Or, nous avons fait, au sujet des défécants, les observations suivantes :

Les réactifs défécants N^{os} 1, 4 et 9 donnent un dépôt d'hydrate ferrique rougeâtre avec décoloration, les réactifs N^{os} 3 et 8 un dépôt d'hydrate jaune avec décoloration.

Nous avons repris les mesures avec une quantité de glucose plus élevée : 80 mgr.

Le réactif de Denigès démolit le complexe et précipite l'hydrate ferrique.

Les autres défécants ont donné les résultats suivants : Tableau N° 6.

Le résultat des dosages est donc en général par défaut avec des écarts allant de 5 à 60 %, sauf pour le réactif d'Esbach, qui accuse *un résultat par excès de* 77 %.

Il résulte donc de ces recherches que si l'opération de la défécation entraîne comme nous le savons déjà par ailleurs une perte de l'ordre de 10 %, l'action du défécant sur le réactif ferrique est tout à fait désastreuse.

Tableau N° 6

	Défécant	Eliminant	Gamme	Sucre retrouvé	Erreur %
1.	Courtonne	SO^4 Na^2	76	95	— 5
2.	Saturne	SO^4 Na^2	72	90	— 10
3.	Acétate de zinc	—	45	56,25	— 43,7
4.	Tungstate de soude	—	43	53,7	— 46,3
5.	Acide trichloracétique	—	32	40	— 60
6.	Réactif d'Esbach	—	140	177	+ 77
7.	Acide phosphotungstique	—	41	51,2	— 48,8
8.	Réactif de Denigès	Zinc	—	—	—
9.	Réactif de Patein-Dufau	Zinc	66	82	— 18

Le sucre retrouvé varie de 40 à 177 %.

Un résultat aussi décevant ne nous a cependant pas découragés : nous avons persisté à reprendre ces recherches sur l'urine pensant que la présence de substances captées par le défécant pouvait modifier les propriétés absorbantes et précipitantes de ce dernier et protéger le réactif ferrique.

2. — Défécants et urine glucosée.

Nous avons employé la même méthode que dans le chapitre précédent, mais au lieu de l'eau, le solvant était de l'urine normale. Nous avons ajouté les défécants dans la proportion de 10 %, sauf le réactif de Patein-Dufau à raison de 50 %.

A. — Dosage par la Méthode de Bertrand

A 4 cm3 d'urine glucosée à 1 % nous avons ajouté 5 cm3 d'urine normale et le défécant. Après filtration, nous avons ajouté l'éliminant, filtré de nouveau et complété avec de l'eau distillée jusqu'au volume de 15 cm3.

Pour le dosage, nous avons pris 10 cm3. Les 15 cm3 contenant 40 mgr. de glucose, les 10 cm3 contiennent 26 mgr. 6, ce qui correspond à 52 mgr. 5 de Cu. Le titre de la solution de permanganate de potasse est : 10 cm3 correspondent à 9,563 mgr. de Cu, donc 10 cm3 de liqueur filtrée correspondent à :

$$\frac{52,5}{9,563} = 5 \text{ cm3 } 5 \text{ de } MnO^4\ K$$

Nous avons trouvé les résultats du Tableau N° 7.

Tableau N° 7

	Défécant	Eliminant	Oeservation	Filtrat	ccMnO⁴ K retrouvé	Sucre % retrouvé	Erreur %
1.	R. de Courtonne.	$SO^4 Na^2$	Abondant précipité	Presque clair	5,6	102	+ 2
2.	Saturne	$SO^4 Na^2$	Abondant précipité	Presque clair	5,0	91	— 9
3.	Acétate de zinc..	—	Léger précipité	Presque clair	5,0	91	— 9
4.	Tungstate de Na.	—	Pas de précipité	Presque clair	5,65	103	+ 3
5.	Acide trichlor-acétique	—	Pas de précipité	Presque clair	—	—	—
6.	R. d'Esbach	—	Pas de précipité	Jaune Clair	5,7	104	+ 4
7.	Acide phospho-tungstique	—	Précipité léger	Presque clair	5,6	102	+ 2
8.	R. de Denigès....	Zinc	Précipité léger	Presque clair	5,4	98	— 2
9.	R. Patein-Dufau..	Zinc	Précipité	Presque clair	5,1	93	— 7

Le sucre retrouvé varie de 91 à 104 %.

B. — Dosage par le Réactif ferrique

A 4 cm3 d'urine glucosée à 10 %, nous avons ajouté 5 cm3 d'urine normale et le défécant. Après filtration, nous avons ajouté l'éliminant, filtré de nouveau et complété avec de l'eau distillée jusqu'au volume de 15 cm3.

Pour le dosage, nous en avons pris 3 cm3. Les 15 cm3 du filtrat contenant 400 mgr. de glucose, *3 cm3 contiennent 80 mgr. de glucose.* Les résultats sont les suivants : Tableau N° 8.

Tableau N° 8

	Défécant	Eliminant	Gamme	Sucre retrouvé %	Erreur %
1.	R. Courtonne ...	$SO^4 Na^2$	68	83	— 17
2.	Saturne	$SO^4 Na^2$	65	81	— 19
3.	Acétate de zinc..	—	50	62,5	— 37,5
4.	Tungstate de Na.	—	65	81	— 19
5.	Acide trichlor-acétique	—	42	52,5	— 47,5
6.	R. d'Esbach	—	165	206	+ 106
7.	Acide phospho-tungstique	—	52	65	— 35
8.	R. de Denigès....	Zinc	Dépôt jaune, décoloration		
9.	R. Patein-Dufau.	Zinc	66	82	— 18

Le sucre retrouvé varie de 52,5 à 206 %.

3. — Dosage du glucose dans des urines albumino-glucosées.

A. — *Dosage par la méthode de* Bertrand.

Nous avons préparé la solution suivante :

Albumine d'œuf en paillettes	2 gr.
Chlorure de sodium	2 gr.
Glucose	1 gr.
Urine normale, q. s. p.	100 cm3

Pour le dosage, nous avons utilisé la technique de page 30.

Dans le cas présent, 10 cm3 de liqueur filtrée correspondent à 5,23 cm3 de MnO^4 K, 52,5 mgr. de cuivre et 26,6 mgr. de glucose.

Nous avons trouvé les résultats suivants : Tableau N° 9.

Tableau N° 9

	Défécant	Eliminant	Observation	Filtrat	ccMnO4K trouvé	Sucre retrouvé %	Erreur %
1.	R. Courtonne	SO^4 Na^2	Abondant précipité	Trouble	5,15	98	— 2
2.	Saturne	SO^4 Na^2	Abondant précipité	Trouble	5,0	95	— 5
3.	Acétate de zinc	—	Abondant précipité	Clair	4,95	94,5	— 5,5
4.	Tungstate de soude	—	Abondant précipité	Légèrement trouble	5,2	99,3	— 0,7
5.	Acide trichloracétique	—	Abondant précipité	Clair	—	—	—
6.	R. d'Esbach	—	Abondant précipité	Jaune clair	5,9	113	+ 13
7.	Acide phosphotungstique	—	Abondant précipité	Clair	5,5	105	+ 5
8.	R. de Denigès	Zinc	Abondant précipité	Clair	5,0	95	— 5
9.	R. Patein-Dufau	Zinc	Abondant précipité	Clair	4,85	92	— 8

Le sucre retrouvé varie de 92 à 113 %.

B. — *Dosage par le réactif ferrique.*

Nous avons préparé la solution suivante :

Albumine d'œuf en paillettes	2 gr.
Chlorure de sodium	2 gr.
Glucose	10 gr.
Urine normale, q. s. p.	100 cm3

A 4 cm3 de cette solution, nous avons ajouté 5 cm3 d'urine normale et le défécant. Après filtration, nous avons ajouté l'éliminant, filtré de nouveau et complété avec de l'eau distillée jusqu'au volume de 15 cm3.

Pour le dosage, nous avons pris 3 cm3 du filtrat. Les 15 cm3 contenant 400 mgr. de glucose, *3 cm3 de liquide déféqué contiennent 80 mgr. de glucose.*

Les résultats sont contenus dans le Tableau N° 10.

TABLEAU N° 10

	DÉFÉCANT	Eliminant	OBSERVATION	Filtration	Gamme	Sucre retrouvé °/₀	Erreur %
1.	R. Courtonne ...	SO^4 Na^2	Abondant précipité	Trouble	66	82	— 18
2.	Saturne	SO^4 Na^2	Abondant précipité	Trouble	63	78	— 22
3.	Acétate de zinc..	—	Abondant précipité	Clair	52	65	— 35
4.	Tungstate de soude	—	Abondant précipité	Trouble	63	78	— 22
5.	Acide trichlor-acétique	—	Abondant précipité	Clair	38	48	— 52
6.	R. Esbach	—	Abondant précipité	Jaune clair	105	130	+ 30
7.	Acide phospho-tungstique	—	Abondant précipité	Clair	50	62,5	— 37,5
8.	R. de Denigès...	Zinc	Abondant précipité	Clair	dépôt jaune, décoloration		
9.	R. Patein-Dufau.	Zinc	Abondant précipité	Clair	65	81	— 19

Le sucre retrouvé varie de 48 à 130 %.

Tous ces résultats sont donc très décevants ; cependant, il nous suffit de nous reporter à la page 25 pour voir qu'ici encore, à une certaine technique de microméthode doit correspondre une technique propre de défécation.

C'est pour élucider ce point que nous avons entrepris les recherches suivantes.

Sixième Partie

ÉTUDE D'UN NOUVEAU RÉACTIF DÉFÉCANT

1. — L'alumine employée comme défécant.

Les observations que nous venons de décrire sur l'action directe des défécants (ou de leur résidu) sur le réactif ferrique aussi bien que leur action sur l'urine glucosée montrent :

1° Que le réactif est très sensible à l'effet de toute substance alcaline, acide et même sel neutre. Des quantités faibles de réactif défécant pouvant encore subsister même après l'application des réactifs éliminants habituels, comme le plomb dans le réactif de Courtonne et l'extrait de Saturne, transforment profondément les conditions de la réaction du tartrate de fer complexe.

2° Les pertes en glucose conformes à l'effet normal des défécants s'aggravent du fait de l'altération de la réaction de réduction et expliquent ainsi les écarts qui non seulement sont énormes mais, fait plus grave encore, sont irréguliers et s'opposent à l'emploi de formules ou de coefficient de conversion.

Force nous a donc été de rechercher un réactif qui n'altère pas la réaction de réduction.

Or, dans la composition du réactif entrent le carbonate de sodium et l'ammoniaque. Les défécants fonctionnent en général par production de précipités amorphes ou colloïdaux, donc de grandes propriétés absorbantes et sélectives. Le carbonate de sodium et l'ammoniaque sont précisément des réactifs propres à l'obtention de précipités colloïdaux ; parmi ceux-ci l'alumine hydratée $Al(OH)^3$ est particulièrement apte à de telles réactions : la formation classique des laques, les propriétés absorbantes de l'alumine très souvent employées nous ont conduit à pratiquer les essais suivants :

Nous avons observé tout d'abord que des sels neutres à ions multiples tels que les sulfates, déséquilibrent la réaction de réduction du complexe tartrique. Au contraire, les nitrates, les chlorures sont pratiquement sans effet perturbateur.

Opérant sur de l'urine normale, nous avons utilisé les sels d'aluminium suivants : sulfate, chlorure, nitrate ; nous avons précipité l'alumine soit à froid, soit à chaud par le carbonate de sodium ou par l'ammoniaque en léger excès. Nous avons observé l'effet sur le réactif

seul et en présence de 30 mgr. de glucose. Les résultats sont contenus dans le tableau suivant :

Tableau N° 11

Sel d'Aluminium		Précipitant	Réactif seul	Réactif et Glucose
Sulfate	1	CO^3 Na^2	Coloration jaune assez forte	Virage au brun clair net mais peu intense
	2	NH^4 OH	Coloration jaune assez forte	Virage au brun clair net mais peu intense
Chlorure	3	CO^3 Na^2	Coloration très faible	Coloration brune plus faible que la précédente
	4	NH^4 OH	Coloration jaune assez forte	Coloration brune assez nette
Nitrate	5	CO^3 Na^2	Précipté Fe $(OH)^3$ liqueur presque incolore	Coloration brune très foncée
	6	NH^4 OH	Coloration jaune assez forte	Coloration brune plus foncée que 4 mais bien moins que 5

Si l'on se rappelle que le réactif ferrique traité par de l'eau pure au bain-marie donne un précipité d'hydrate ferrique surmonté d'une liqueur incolore, on voit que les meilleures conditions de la défécation sont les suivantes :

a) Urine sans albumine, ou liqueur biologique sans albumine.

Urine 50 cm3
Solution nitrate d'aluminium 1/5e 5 cm3

mélanger et agiter, ensuite ajouter :

Solution de CO^3 Na^2 à 40 % 1 cm3

agiter, laisser reposer un quart d'heure, filtrer, ajouter 12 % aux résultats pour tenir compte de la dilution, opérée ci-dessus.

b) Urine ou liquide biologique avec albumine.

Urine 100 cm3
Cristaux Na Cl ..... 0,50 gr. environ

faire bouillir 5 minutes, refroidir, compléter à 100 cm3 et filtrer. Le résidu desséché sert au dosage de l'albumine après lavage. Prendre 50 cm3 du filtrat, continuer le traitement décrit précédemment.

2. — Action de quelques constituants normaux de l'urine sur le réactif ferrique.

Pour étudier l'application de la réduction aux urines, nous avons entrepris l'étude individuelle des constituants normaux agissant sur le réactif ferrique.

A l'urine normale (23,4 gr. d'urée par litre avant la défécation, 22,5 gr. après défécation par Saturne et 21,2 gr. après Courtonne), nous avons ajouté :

a) 0,5 ; 1 et 1,5 % d'*urée*.

b) 0,5 ; 1 et 1,5 cm3 d'une solution saturée d'*acide urique*, dont la dose moyenne chez l'homme normal est 0,36 gr. pour mille et qui est éliminée par les défécants Courtonne et Saturne.

c) 0,2 ; 0,4 et 0,6 % de *créatinine*. La réaction de Jaffé était positive avant et après les défécations.

Une quantité de glucose ajoutée à ces différentes urines a été dosée par le réactif ferrique donnant exactement les résultats attendus.

3. — Action de quelques constituants anormaux dans l'urine sur le réactif ferrique.

Nous avons ajouté à l'urine normale :

a) 0,4 ; 0,8 et 1 % d'*extrait de bile*.

b) 0,6 ; 0,8 et 1 % d'*acétone*

et une quantité connue de glucose dont les dosages par le réactif ferrique ont donné les chiffres attendus.

4. — Action de quelques médicaments sur le réactif ferrique.

Nous avons pris les médicaments qui passent dans les urines dans le même état sans changement notable.

Nous avons ajouté à l'urine normale :

a) 0,3 ; 0,6 et 1 % d'*antipyrine*. Les réactions avec le perchlorure de fer et nitrite de soude étaient positives avant et après la défécation.

b) 0,5 ; 1 et 1,5 % d'*hexaméthylènetétramine*. La réaction de l'eau de brome était positive avant et après les défécations.

c) 0,1 ; 0,3 et 0,4 % de *phénol*. La réaction avec le chlorure ferrique était positive avant et après la défécation.

d) 0,3 ; 0,5 et 0,6 % de *salicylate de soude*. La réaction avec le perchlorure de fer était positive.

Le dosage d'une quantité connue de glucose ajoutée à tous ces échantillons par le réactif ferrique donnait des résultats identiques

sauf avec le salicylate, où la teinte était un peu plus foncée que celle du témoin. Les recherches sont à reprendre avec le réactif défécant propre au réactif ferrique.

D'une manière générale, les constituants normaux et anormaux des urines, ainsi que quelques médicaments ajoutés *individuellement* à des solutions de glucose dans l'eau ou dans l'urine, ne modifient pas le dosage par notre technique.

Septième Partie

NOUVELLE TECHNIQUE PAR ESBACH

1. — Etude de l'effet du réactif d'Esbach sur le réactif ferrique.

Pendant nos recherches avec les différents défécants, nous avons pu observer que le réactif d'Esbach produisait une exaltation énorme (jusqu'à 600 %) de la teinte donnée par le réactif ferrique. Il nous paraissait intéressant d'étudier quel est tout d'abord le composé du réactif d'Esbach qui provoque cette exaltation et ensuite les possibilités et les limites d'un dosage des sucres par le réactif d'Esbach et le réactif ferrique ensemble.

Sur le réactif tartrate ferrico-potassique, le réactif d'Esbach, en milieu ammoniacal ou non, est sans action.

La présence de glucose ne produit pas de réduction du mélange s'il n'y a pas d'ammoniaque ; le mélange des quatre substances développe une coloration rouge légèrement orangée très intense.

Des constituants du réactif d'Esbach, acide picrique et acide citrique, il est clair que l'acide picrique seul intervient dans la réduction. L'absence d'ammoniaque montre que le système tamponné à l'acide citrique ne permet pas la réduction ; pour l'obtenir, il faut augmenter le pH et tamponner dans l'ammoniaque ou le citrate d'ammoniaque.

En solution ammoniacale, l'acide picrique est réduit au bain-marie par le glucose en acide picramique. La teinte limite est obtenue en 20 minutes au bain-marie bouillant. Cependant, si la teinte de la gamme avec le réactif d'Esbach est nettement plus rouge que celle avec le réactif ferrique seul, *la somme des deux réductions séparées est beaucoup moins intense que si les réactifs sont réunis dans la même solution.*

Exemple : 50 mgr. de glucose, 2 cm3 de solution d'acide picrique à 1 % et dix gouttes d'ammoniaque donnent une coloration voisine de celle que l'on obtient avec 25 mgr. de glucose, le réactif ferrique et le réactif d'Esbach.

Si l'on ajoute la teinte donnée par 50 mgr. de glucose dans les conditions sus-indiquées à la teinte donnée par 25 mgr. de glucose réduisant le réactif ferrique seul, on n'atteint pas de loin la teinte donnée par les deux réactifs ensemble dans la solution.

2. — Dosage picrato-picrique.

Nous avons rappelé page 10 du présent travail, la technique de Mestrezat basée sur l'emploi de l'acide picrique. L'ingéniosité de cette technique réside non seulement dans la réaction de réduction elle-même, mais aussi dans l'emploi de l'acide picrique pris à dose massive sous forme de picrate de sodium pour permettre la défécation du liquide biologique.

Cependant, comme l'a montré Mestrezat, cette technique est en défaut pour certaines substances présentes dans les liquides biologiques et *surtout ne fonctionne pas pour les urines.*

L'exaltation de la couleur par la présence du réactif ferrique montre que la présence du tartrate ferrique complexe catalyse la réaction picrato-picrique.

Nous ferons l'application de cette observation pour introduire dans la Huitième Partie une modification à la technique de Mestrezat qui en facilite l'appréciation et en élargit les limites.

3. — Echelles médicales a choisir.

Pour la commodité des manipulations, nous proposons les échelles suivantes :

1° *Gamme médicale I*

Pour les solutions de sucres réducteurs par dosage direct, nous proposons une gamme de concentrations avec le *réactif ferrique seul* allant de 10 à 130 mgr. de glucose dans la prise d'essai suivant l'échelle ci-dessous qui est commode :

10, 13, 16, 20, 23, 26, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 90, 100, 115, 130 mgr. de glucose, soit 20 tubes.

2° *Gamme médicale II*

Pour les liquides moins concentrés et par dosage direct, nous proposons la gamme avec *le réactif ferrique et le réactif d'Esbach combinés,* allant de 3 à 35 mgr. de glucose dans la prise d'essai, suivant l'échelle :

3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17.5, 20,, 25, 30, 35 mgr. de glucose, soit 12 tubes.

Le réactif d'Esbach étant un réactif classique des liquides albuminés, il permet donc une défécation préliminaire des liquides albumino-glucosés.

HUITIÈME PARTIE

MICRODOSAGES COLORIMÉTRIQUES AVEC LES RÉACTIFS D'ESBACH ET FERRIQUE COMBINÉS

1° ETUDE DE LA RÉGULARITÉ DE LA RÉACTION.

Rappelons tout d'abord la technique picrato-picrique de MESTREZAT exposée page 10.

Nous avons cherché à tirer parti de la grande exaltation de teinte due à la présence simultanée des deux réactifs.

Pour cela, nous avons effectué divers essais afin d'établir la régularité de la réaction.

Une réduction portant sur 1 cm3 de réactif ferrique, 2 cm3 de réactif d'Esbach, dix gouttes d'ammoniaque, de doses variables de glucose et de l'eau q. s. pour 20 cm3 ont donné les résultats suivants :

Le temps de réduction au bain-marie doit être de 15 minutes il est inutile de continuer à chauffer, la teinte ne change plus.

Une quantité plus faible de réactif d'Esbach (0,9 ou 1,8 cm3) ne donne pas de différence appréciable de teinte pour des quantités de glucose allant de 0,5 à 0,7 mgr.

Le fait de doubler ou quadrupler la quantité de réactif ferrique n'augmente nullement la sensibilité.

Nous avons cependant observé des différences nettes de teinte en rapport avec la concentration en glucose en virant dans *l'axe du tube,* c'est-à-dire sous 20 centimètres d'épaisseur au lieu de 1 cm 5 (diamètre du tube à essai).

2° MESURES AU PHOTOCOLORIMÈTRE.

Nous avons essayé de substituer à l'appréciation de l'œil, celle du photocolorimètre à cellule photo-électrique au sélénium de Hellige.

Sur une cuve de 2 centimètres d'épaisseur, nous avons choisi une déviation de l'aiguille du millivoltmètre de 50 divisions avec une solution témoin ne contenant pas de glucose.

Par rapport à cette déviation, des solutions contenant 0,5 ; 0,6 et 0,7 mgr. de glucose ont produit une variation selon la lumière de :

	lumière verte	lumière blanche
0,5 mgr. de glucose	1,5 divisions	1,5 divisions
0,6 —	2,5 —	4 —
0,7 —	4,5 —	7 —

On voit que sans être très forte, ces différences sont assez grandes pour ne pas faire de doute, le passage du glucose de 0,5 à 0,7 mgr. entraînant une variation de la déviation de 5,5 divisions.

L'augmentation de la concentration en réactif ferrique n'a pas produit de différences appréciables.

En comparant la concentration en acide picrique dans la technique de MESTREZAT et la nôtre et tenant compte des dilutions, nous avons constaté que notre solution est 12,5 fois moins concentrée que celle de MESTREZAT.

3° COMPARAISON DES DEUX TECHNIQUES APRÈS DÉFÉCATION.

Nous avons alors comparé les deux techniques *après la défécation.*

On a vu, en effet, que la dose élevée du picrate de sodium permet une défécation directe en mélangeant à parties égales le liquide biologique et l'acide picrique.

4 cm3 du filtrat ont été employés pour la technique de MESTREZAT par traitement au bain-marie pendant 20 minutes après addition de 0,5 cm3 de carbonate de sodium.

4 autres cm3 ont été additionnés de 1 cm3 de réactif ferrique, et dix gouttes d'ammoniaque et chauffés aussi au bain-marie pendant 20 minutes.

Nous avons travaillé avec 0,6 ; 1 et 1,6 mgr. de glucose dans la prise d'essai.

La dilution porte le volume final à 12,5 cm3 par la technique de MESTREZAT et à 20 cm3 par la nôtre.

Le résultat est le suivant :

Nous avons observé une nette différence entre les 3 doses. Cependant, la technique de MESTREZAT permet un meilleur contraste, même à partir de la plus faible dose, alors que par le réactif ferrique il ne semble devoir apparaître de différence que pour plus de 0,6 mgr. de glucose qui donne une teinte jaune, laquelle vire au rouge-orangé pour des doses plus fortes.

Pour mieux accuser la différence, nous avons porté la dilution, dans notre méthode, à 10 cm3 seulement.

Le rapport des teintes obtenues est à peu près le suivant :

Technique MESTREZAT glucose 0,6 mgr. 1 mgr. 1,6 mgr. »
la nôtre ..... » 0,6 mgr. 1 mgr. 1,6 mgr.

autrement dit 0,6 mgr. de glucose en présence du réactif ferrique donne la même teinte que 1 mgr. sans réactif ferrique.

La sensibilité de la technique a donc pratiquement doublé.

En doublant le volume de réactif ferrique, c'est-à-dire en prenant 2 cm3 de ce réactif et 20 gouttes (ou 1 cm3) d'ammoniaque, nous avons observé la modification suivante :

Technique MESTREZAT	0,6 mgr.	1 mgr.	1,6 mgr.	»	»
notre technique	»	»	0,6 mgr.	1 mgr.	1,6 mgr.

Dans ces conditions, la sensibilité a pratiquement triplé.

Nous aurions pu suivre cette exaltation de teinte au photocolorimètre de Hellige.

Nous avons préféré revenir à la comparaison avec la rampe de tubes à essais et le comparateur. Pour des raisons de coloration, nous avons employé la gamme médicale II (page 39) au réactif d'Esbach.

Voici quelle serait en milligrammes de glucose la correspondance entre la semi-microméthode et les microméthodes sus-indiquées :

	Microméthode	Gamme II
	—	—
Technique MESTREZAT	0,6 mgr. de glucose	3,5 mgr. de glucose
	1,0 —	5 —
	1,6 —	10 —
notre technique	0,6 —	9 —
	1,0 —	12,5 —
	1,6 —	15 —

La technique MESTREZAT donne par *rapport à la gamme II* une variation plus proportionnelle que notre technique, mais il faut tenir compte de ce fait que pour beaucoup de liquides biologiques et *en particulier le liquide céphalo-rachidien,* la région intéressante est comprise entre 0 et 1 mgr. Or, dans cette région, notre technique présente un avantage certain par un renforcement de la teinte qui devient sensiblement trois fois plus intense.

Nous l'attribuons à un effet catalytique du tartrate ferrique sur la réduction picrique-picramique.

4° APPLICATION AU SEMI-MICRODOSAGE DU GLUCOSE DANS LES LIQUIDES BIOLOGIQUES FORTEMENT ALBUMINÉS.

A. — *Dosage du glucose dans du liquide céphalo-rachidien.*

Ce liquide fut prélevé après traumatisme cranio-cérébral, avec hémorragie sous-arachnoïdienne avec réaction méningée intense (*a*).

Echantillon N° A : 3 jours après le traumatisme.

— N° B : 5 — —

— N° C : 7 — —

(*a*) Service de chirurgie de M. le Professeur P. PIOLLET, à qui nous sommes heureux d'adresser ici nos vifs remerciements.

Selon la technique sus-indiquée, nous avons mêlé à parties égales le liquide céphalo-rachidien A et la solution de picrate de sodium. Le mélange a été filtré ; 4 cm3 introduit dans tube N° 1 ont été traités par la technique de MESTREZAT, 4 cm3 dans le tube N° 4 ont été traités par notre technique. Il en fut de même pour les échantillons B et C. Nous avions ainsi en expérience comparative dans les tubes 1, 2, 3 des échantillons traités par la méthode de MESTREZAT et dans les tubes 4, 5, 6 les résultats de notre technique. Un tube étalon contenant 0,50 gr. de glucose par litre a servi aux comparaisons colorimétriques par le colorimètre de Duboscq.

L'une et l'autre technique ont donné indépendamment l'une de l'autre par rapport à chaque étalon le même résultat à 1 % près.

La gamme médicale II que nous avons proposée page 39 ne peut pas servir en raison de haute teneur du réactif picrate de sodium, mais on comprend, qu'à l'exemple de MESTREZAT, il soit aisé de réaliser une gamme spéciale au microdosage.

B. — *Dosage du glucose dans un liquide de kyste de l'ovaire* (*a*).

Le liquide qui nous a été fourni était très louche, très épais, coulant comme du sirop. Il était très riche en albumine.

Un dosage préliminaire par rapport à une solution étalon contenant 0,50 gr. de glucose par litre nous a montré que la concentration en glucose était très forte. Nous avons alors dilué au dixième le filtrat de la défécation. Nous avons trouvé 3,10 et 3 gr. par la technique de MESTREZAT et 2,95 et 2,85 gr. de glucose par litre selon notre technique.

C. — *Dosage du glucose dans un liquide d'ascite* (*b*).

Dans les mêmes conditions et en diluant encore au 1/10 le filtrat de la défécation, nous avons trouvé exactement les mêmes résultats par les deux techniques, à savoir 1,8 gr. pour mille.

D. — *Dosage du glucose dans un liquide d'épanchement pleural* (*b*).

Dans les mêmes conditions de dilution, nous avons trouvé 2,5 gr. pour mille par la technique de MESTREZAT et 2,4 gr. par la nôtre.

Ces exemples démontrent qu'après la défécation par le réactif picrique, l'emploi du tartrate ferrique comme exaltant de la teinte jaune-orangé est parfaitement justifié. Inutile de dire que la couleur des tubes correspondant à notre technique était dans tous les cas beaucoup plus intense que dans la technique de MESTREZAT. Or, dans un mémoire très complet, MESTREZAT (10) indique la possibilité de doser 0,1 mgr. de glucose. Il semble que la technique d'appréciation de la teinte soit délicate : nous pensons que l'exaltation due au réactif ferrique pourrait rendre des services dans ce cas extrême.

(*b*) Nous remercions M. le Professeur DODEL qui a eu l'obligeance de nous envoyer les échantillons.

CONCLUSIONS

Le réactif tartrate ferrico-potassique en liqueur ammoniacale étudié par Mlle Dubois est réduit régulièrement par le glucose et donne des teintes brunes de plus en plus foncées suivant la concentration du glucose.

Les teintes forment une gamme qui permet des dosages très rapides par la méthode de la fourchette ou avec le comparateur de Walpole pour des doses allant de 10 à 130 mgr. dans la prise d'essai.

Nous avons étudié la stabilité, qui est bonne, si la gamme est conservée en tubes paraffinés pendant 4 mois au frais et à l'abri de la lumière.

Une telle gamme permet, avec un coefficient de conversion, de faire le dosage du lactose et celui du lévulose. Elle permet donc de prévoir des applications en chimie alimentaire.

L'application directe à la chimie biologique pour le dosage du glucose dans les sécrétions et les sérosités, se heurte à une grosse difficulté, le tartrate ferrique se comportant comme un défécant.

Nous avons montré que les défécants classiques et leurs réactifs d'élimination troublent la réaction de réduction du tartrate ferrico-potassique et nous proposons une défécation par l'hydrate d'aluminium précipité à partir de l'azotate par le carbonate de sodium.

L'étude systématique des défécants nous a montré que l'acide picrique agit parallèlement au tartrate ferrico-potassique dans son action sur le glucose.

Nous en avons tiré une gamme médicale de sensibilité, 3 à 40 mgr. de glucose dans la prise d'essai.

Nous avons montré qu'une technique imitée de celle de Mestrezat dans le microdosage picrato-picrique de glucose, nous conduit à une exaltation de la teinte par réduction simultanée de l'acide picrique et du tartrate ferrico-potassique.

Nous attribuons cet effet à une action catalytique du réactif tartrate ferrico-potassique sur l'acide picrique.

Nous proposons en conséquence :

1° Une semi-microméthode pour des volumes de l'ordre de 1 cm3 de liquide albumino-glucosé contenant *quelques grammes de glucose par litre*. Nous l'avons appliqué à du liquide céphalo-rachidien, du liquide de kyste, du liquide d'ascite, du liquide d'épanchement pleural.

2° Une microméthode pour des volumes de l'ordre de 2 cm3 avec *0,1 à 1 gramme de glucose par litre.*

Nous ne prétendons pas substituer notre technique à la méthode si élégante et si ingénieuse de MESTREZAT, mais nous pensons que l'exaltation de la teinte pourra permettre une application peut-être plus large et plus aisée.

VU, Clermont-Ferrand, le 23 Juin 1941.
Le Président du Jury,
CH. LAPP.

VU ET APPROUVÉ :
Clermont-Ferrand, le 25 Juin 1941.
Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,
A. SARTORY.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :
Clermont-Ferrand, le 27 Juin 1941.
Le Recteur de l'Académie,
Président du Conseil de l'Université,
Pour le Recteur :
Le Vice-Président du Conseil de l'Université,
A. DANJON.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Ambert. — Thèse Pharmacie, Paris, 1929.

(2) Back R. — Contribution à l'étude des microdosages des substances glucidiques réductrices du sang. Thèse Pharmacie, Strasbourg, 1937.

(3) Benedict and Osterberg. — Journ. of Biol. Chem., 24, p. 1915_ 1918.

(4) Bochner P. — Recherches sur l'action des divers défécants. Thèse Pharmacie, Strasbourg, 1934.

(5) Dubois A. D. — Etude physico-chimique des tartrates complexes K Na Fe ; Na Ni Thèse Pharmacie, Strasbourg, 1940.

(6) Fleury P. — Technique de chimie biologique, pages 75 et 76. Les Fiches scientifiques Véga.

(7) Fleury et Courtois. — Journ. de Pharm. et Chim., 8/16, 1932, p. 97 et 145.

(8) Guiart et Grimbert. — Diagnostic_ p. 882, édition IV, Lamarre, éditeur.

(9) Lewis and Benedict. — A methode for estimation of sugar in small quantities of blood, Journ. of Biol. Chem., 1915, 20, p. 61-72.

(10) Mestrezat et Mlle Garreau. — Bull. Soc. Chim._ 5, 1923, p. 41.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS 6
INTRODUCTION 7

PREMIÈRE PARTIE

RÉACTIONS COLORÉES DES SUCRES 9
A. — Qualitatives 9
B. — Quantitatives 10

DEUXIÈME PARTIE

LE RÉACTIF TARTRATE FERRIQUE 12
1. — Le tartrate ferrico-potassique en solution ammoniacale 12
2. — Stabilité du réactif 12
3. — Mode de réduction du complexe tartrique K Na Fe 13
4. — Applications pratiques : Méthode de la fourchette 13

TROISIÈME PARTIE

TECHNIQUE DE PRÉPARATION DES GAMMES 16
1. — Technique 16
2. — Conservation, stabilité, sensibilité 16
3. — Altération de la teinte par l'oxygène de l'air 17
4. — Influence de la lumière 18
5. — Précision des dosages de glucose par la méthode colorimétrique 19
6. — Influence d'un délai sur la précision du dosage du glucose 19
7. — Discussion de la précision et limites d'emploi 19
8. — Comparaisons des différents sucres 20

QUATRIÈME PARTIE

LA QUESTION DE LA DÉFÉCATION 22
1. — Préliminaires 22
2. — Action des réactifs défécants 22
3. — Etude systématique de l'entraînement des sucres 23
4. — Généralisation des recherches sur l'entraînement des sucres 24
5. — Etude comparative des microdosages classiques 25
6. — Conclusions 26

Cinquième Partie

ACTION DES DÉFÉCANTS SUR LE RÉACTIF FERRIQUE 27
1. — Action des défécants sur des solutions aqueuses de glucose 28
2. — Actions des défécants sur l'urine glucosée 30
3. — Dosage du glucose dans des urines albumino-glucosées 32

Sixième Partie

ÉTUDE D'UN NOUVEAU RÉACTIF DÉFÉCANT 34
1. — L'alumine employée comme défécant 34
2. — Action des constituants normaux de l'urine sur le réactif ferrique .. 36
3. — Action des constituants anormaux de l'urine sur le réactif ferrique .. 36
4. — Action des médicaments sur le réactif 36

Septième Partie

NOUVELLE TECHNIQUE PAR ESBACH 38
1. — Etude de l'effet du réactif d'Esbach sur le réactif ferrique 38
2. — Dosage picrato-picrique 39
3. — Echelles médicales à choisir 39

Huitième Partie

MICRODOSAGES COLORIMÉTRIQUES AVEC LES RÉACTIFS D'ESBACH ET FERRIQUE COMBINÉS 40
1. — Etude de la régularité de la réaction 40
2. — Mesures au photocolorimètre 40
3. — Comparaison des deux techniques après défécation 41
4. — Applications médicales 42

CONCLUSIONS 44

BIBLIOGRAPHIE 46